

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-262700

(43)Date of publication of application : 06.10.1998

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68

(21)Application number : 10-045690

(71)Applicant : SMITHKLINE BEECHAM CORP

(22)Date of filing : 26.02.1998

(72)Inventor : CHIANG CHIH-SHENG  
CUAN JOSE F

(30)Priority

Priority number : 97 39583 Priority date : 28.02.1997 Priority country : US

(54) FLUORESCENT ENERGY TRANSFER BY COMPETITIVE HYBRIDIZATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To detect the presence of a nucleotide by amplifying the target nucleic acid by using a probe having fluorophore, and a probe complementary to the probe and having quencher molecule of the fluorescence, and monitoring the fluorescence of the fluorophore.

SOLUTION: The detection of the presence of a nucleotide or the monitoring of the amplification of the nucleotide is carried out by amplifying the nucleic acid about the target polynucleotide (the amplification is carried out by either of the method using the first oligonucleotide probe and the method using the second probe having a different length at least two bases shorter than the first probe. The first probe has a fluorophore, and the second probe is complementary to the first probe and has a quencher molecule capable of quenching the fluorescence of the fluorophore. The fluorophore binds with the quencher at the position capable of distinguishing the fluorescence when the probes are hybridized.) and monitoring the fluorescence of the fluorophore, that is the generation of the fluorescence corresponding to the presence of the nucleic acid amplification.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 19.06.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3016759

[Date of registration] 24.12.1999

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-262700

(43) 公開日 平成10年(1998)10月6日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 1 2 Q 1/68

識別記号  
Z N A

F I  
C 1 2 Q 1/68

Z N A A

審査請求 有 請求項の数12 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平10-45690

(22) 出願日 平成10年(1998)2月26日

(31) 優先権主張番号 60/039583

(32) 優先日 1997年2月28日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591002957

スミスクライン・ビーチャム・コーポレイ  
ション

SMITHKLINE BEECHAM  
CORPORATION

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406-  
0939、キング・オブ・ブルシア、スウェー  
ドランド・ロード709番

(72) 発明者 チー・シェン・チアン

アメリカ合衆国91311カリフォルニア州チ  
ャッツワース、オークデイル・アベニュー  
10339番

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 競争的ハイブリダイゼーションによる蛍光エネルギー転移

(57) 【要約】

【課題】 ヌクレオチドの存在の検出またはヌクレオチ  
ド増幅のモニタリングのための方法を提供する。

【解決手段】 競争的ハイブリダイゼーションによる蛍  
光エネルギー転移を用いる方法が提供される。一方のプロ  
ープ上に発蛍光団を有し、他方のプローブ上に消光剤  
を有する等しくない長さの相補的プローブを用いること  
により競争的ハイブリダイゼーションが行われる。発蛍  
光団および消光剤は、発蛍光団への消光剤の近接により  
発蛍光団の蛍光が消されるように並置される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的ポリヌクレオチドについて核酸増幅を行うこと（第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび長さが少なくとも約2塩基対短いことにより長さの異なる第2のオリゴヌクレオチドプローブを用いる何れかの方法を用いて増幅を行い、第1のプローブは発蛍光団を有し、第2のプローブは第1のプローブに相補的で、該発蛍光団の蛍光を消すことのできる消光剤分子を有するものであり、発蛍光団および消光剤は、プローブがハイブリダイゼーションした場合に消光剤分子が発蛍光団の蛍光を消す位置でそれらの個々のプローブ上に結合するものであり、長い方のプローブは優先的に標的ポリヌクレオチドに結合し、優先的に標的ポリヌクレオチドに結合する場合、発蛍光団の蛍光強度は、第2のプローブにハイブリダイゼーションする場合の発蛍光団の蛍光強度よりも大きいものである）、次いで、発蛍光団の蛍光、すなわち核酸増幅の存在に対応する蛍光の発生をモニターすることを特徴とする核酸増幅のモニタリング方法

【請求項2】 核酸ポリメラーゼが耐熱性核酸ポリメラーゼである請求項1の方法。

【請求項3】 第1のプローブ上の発蛍光団および第2のプローブ上の消光剤分子が同一のハイブリダイゼーションした塩基対上にある請求項1の方法。

【請求項4】 発蛍光団および消光剤分子が互いに約1個ないし3個のハイブリダイゼーションした塩基対中にある請求項1の方法。

【請求項5】 発蛍光団および消光剤分子が互いに3個またはそれ以上のハイブリダイゼーションした塩基対中にある請求項1の方法。

【請求項6】 発蛍光団が第1のプローブの5'末端ヌクレオチド上にあり、消光剤が第2のプローブの3'末端ヌクレオチド上にある請求項1の方法。

【請求項7】 発蛍光団が第1のプローブの3'末端ヌクレオチド上にあり、消光剤が第2のプローブの5'末端ヌクレオチド上にある請求項1の方法。

【請求項8】 第1のプローブのヌクレオチド配列からの3個またはそれ以上の3'末端ヌクレオチドの欠失により第2のプローブが第1のプローブよりも短い請求項1の方法。

【請求項9】 第1のプローブのヌクレオチド配列からの3個またはそれ以上の5'末端ヌクレオチドの欠失により第2のプローブが第1のプローブよりも短い請求項1の方法。

【請求項10】 第1のプローブの3個またはそれ以上の5'末端ヌクレオチドの欠失および第1のプローブの1個またはそれ以上の3'末端ヌクレオチドの欠失により第2のプローブが第1のプローブよりも短い請求項1の方法。

【請求項11】 第1および第2のプローブが2℃またはそれ以上異なる解離温度を有する請求項1の方法。

【請求項12】 核酸試料を適当な溶液中に入れ、第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび長さが少なくとも約2塩基対短いことにより長さの異なる第2のオリゴヌクレオチドプローブとともにインキュベーションすること（第1のプローブは発蛍光団を有し、第2のプローブは第1のプローブに相補的で、該発蛍光団の蛍光を消すことのできる消光剤分子を有するものであり、発蛍光団および消光剤は、プローブがハイブリダイゼーションした場合に消光剤分子が発蛍光団の蛍光を消す位置でそれらの個々のプローブ上に結合するものであり、長い方のプローブは優先的に標的ポリヌクレオチドに結合し、優先的に標的ポリヌクレオチドに結合する場合、発蛍光団の蛍光強度は、第2のプローブにハイブリダイゼーションする場合の発蛍光団の蛍光強度よりも大きいものである）、次いで、発蛍光団の蛍光、すなわち特定の核酸配列の存在に対応した蛍光の発生をモニターすることの特徴とする、調製された核酸試料中の特定の核酸配列の存在の検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一方のプローブ上に発蛍光団（fluorophore）を有し、他方のプローブ上に消光剤（quencher）を有する、等しくない長さの相補的プローブに関する。発蛍光団および消光剤は、発蛍光団への消光剤の近接により発蛍光団の蛍光が消されるように並置される。これらのプローブは配列相補性を有するヌクレオチドの検出に有用である。その検出能力は、等しくない長さのプローブの使用により起こる競争的ハイブリダイゼーション、およびその後この競争的ハイブリダイゼーションにより引き起こされる消光の抑制によるものである。

## 【0002】

【従来の技術】核酸増幅法は、非常に少量のヌクレオチドを高濃度としていくつかの手段により検出されようようにするための方法の1つとなっている。いくつかの増幅方法が使用できる。もっとも広く行われている方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（あるいは現在一般的にPCRと呼ばれている）である。増幅法によって検出または回収および使用できる標的ヌクレオチド配列数が増加するが、増幅生成物の検出には高感度の方法が必要である。また、増幅法は、増幅プロセスのリアルタイムモニタリングの恩恵を受ける。リアルタイムモニタリングにより反応性のない増幅を検出でき、あるいはプロセスの無効率を検出できる。増幅反応を妨害せずにかかるモニタリングを行うことができる場合には、リアルタイムモニタリングを用いた負荷オリゴヌクレオチドの定量も可能である。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題および課題を解決するための手段】本発明手続は、互いに配列相補性を有する発

蛍光団標識プローブおよび消光剤標識プローブの間の蛍光エネルギー転移に基づいている。使用プローブは等しくない長さであり、そのことは一方のプローブがその相補的プローブにアニーリングする以上に標的核酸配列にアニーリングすることを促進する。プローブ配列に相補的または同一の配列を有する核酸（標的配列）の不存在下では、2つのプローブは互いにアニーリングするであろう。2つのプローブが互いにアニーリングする場合、発蛍光団への消光剤の近接により発蛍光団の蛍光の消光が起こる。プローブ配列に相補的または同一の配列を有する核酸の存在下では、発蛍光団標識プローブのいくつかは相補的配列を有する核酸にハイブリダイゼーションし、消光剤から離され、増大した（消光されない）蛍光を生じるであろう。標的配列を有する核酸の存在の特異的検出にこの蛍光の相違を用いることができる。

【0004】第1の態様において、本発明は、標的ポリヌクレオチドについて核酸増幅を行うこと（第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび長さが少なくとも約2塩基対短いことにより長さの異なる第2のオリゴヌクレオチドプローブを用いる何れかの方法を用いて増幅を行い、第1のプローブは発蛍光団を有し、第2のプローブは第1のプローブに相補的で、該発蛍光団の蛍光を消すことのできる消光剤分子を有するものであり、発蛍光団および消光剤は、プローブがハイブリダイゼーションした場合に消光剤分子が発蛍光団の蛍光を消す位置でそれらの個々のプローブ上に結合するものであり、長い方のプローブは優先的に標的ポリヌクレオチドに結合し、優先的に標的ポリヌクレオチドに結合する場合、発蛍光団の蛍光強度は、第2のプローブにハイブリダイゼーションする場合の発蛍光団の蛍光強度よりも大きいものである）、次いで、発蛍光団の蛍光、すなわち核酸増幅の存在に対応する蛍光の発生をモニターすることを特徴とする核酸増幅のモニタリング方法に関する。また本発明は、等しくない長さのプローブを用いて標的ポリヌクレオチドの存在を検出する方法にも関する。発蛍光団および消光剤とアニーリングしたプローブも本発明の一部分である。

#### 【0005】

【発明の実施の形態】本発明は、いずれかの方法による標的ポリヌクレオチドの増幅とともに用いられる。これらの増幅方法は、PCR、リガーゼ連鎖反応（LCR）、ギャップPCR、転写により媒介される増幅（TMA）核酸配列に基づく増幅（NASBA）、および鎖置換増幅（SDA）を包含する。PCRは最も興味深い。PCRは、Innis, et al, editors, PCR Protocols (Academic Press, New York, 1989) ; Sambrook et al., Molecular Cloning, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989) 等多くの文献に記載されている。オリゴヌクレオチドプローブ結合部位は、標的ポリヌクレオチドを増幅するのに用いるPCRプライマー間

に存在する。いずれのポリメラーゼを用いてPCRを行ってもよい。標的ポリヌクレオチドから生じる複製物が多いほど蛍光シグナル強度は強くなるので、標的ポリヌクレオチド数を増加させるポリメラーゼはこの方法に都合がよい。好ましくは、耐熱性ポリメラーゼを用いてPCRを行う。好ましい酵素はTaq DNAポリメラーゼ、例えば、Amplitaq<sup>TM</sup> (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.) または同等の耐熱性DNAポリメラーゼである。PCRのアニーリング温度は、使用オリゴヌクレオチドプローブの融解温度よりも約5ないし10℃低い温度であろう。ポリメラーゼPwoは本発明でうまく用いられた。

【0006】本明細書の用語「オリゴヌクレオチド」は、天然または修飾モノマーまたは連結物からなる直鎖状オリゴマーを包含し、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド等があり、それらはワトソンクリック型の塩基対合等のごときモノマー対モノマーの通常のパターンにより標的ポリヌクレオチドに特異的に結合する。通常には、モノマーはホスホジエステル結合またはその類似結合により結合しており、数個のモノマー単位、例えば3ないし4個ないし数十個のモノマー単位のサイズのオリゴヌクレオチドを形成している。オリゴヌクレオチドが「ATGCCCTG」のごとき文字配列により表される場合、そのヌクレオチドは左から右へ5' から3' 方向を表すものとし、特記しない限り、「A」はデオキシアデノシン、「C」はデオキシシチジン、「G」はデオキシグアノシン、「T」はチミジンを表す。ホスホジエステル結合のアナログとしては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホラニリデート、ホスホラミダイト等がある。一般的には、本発明オリゴヌクレオチドプローブはその5' 末端近傍に十分な数のホスホジエステル結合を有しており、使用するエキソヌクレアーゼ活性は5' から3' 方向へと効果的に結合プローブを分解してリポーターおよび消光剤分子を分離させることができる。

【0007】2本鎖についていう「完全に対合」とは、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド鎖が他の鎖と2本鎖構造を形成して、各鎖の各ヌクレオチドがワトソンクリック型の塩基対合をしていることを意味する。また、その用語は、デオキシイノシン、2-アミノプリン塩基と一緒になったヌクレオシド等のごときヌクレオシドアナログの対合も包含し、それらを用いることができる。逆に、標的ポリヌクレオチドとオリゴヌクレオチドプローブもしくはプライマーとの間の2本鎖における「ミスマッチ」は、2本鎖中のヌクレオチドペアがワトソンクリック型の結合をしないことを意味する。

【0008】多くの方法により、例えば、Ozaki et al, Nucleic Acids Research, 20:5205-5214 (1992) ; Agrawal et al, Nucleic Acids Research, 18:5419-5423 (1990) 等

の方法により本発明オリゴヌクレオチドプローブを合成することができる。便利には、本発明オリゴヌクレオチドプローブを、例えばBeaucage and Iyer, tetrahedron, 48:2223-2311(1992); Molkoらの米国特許第4980460号; Kosterらの米国特許第4725677号; Caruthersらの米国特許第4415732号、4458066号および4973679号等の文献に開示されたホスホラミダイト化学のごとき標準的な化学を用いて、自動DNA合成装置、例えば、Applied Biosystems, Inc. Foster City, Calif. の392または394型DNA/RNA合成装置により合成する。別の化学、例えばホスホロチオエート、ホスホラミダイトのごとき非天然骨格グループを用いてもよいが、得られるオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション効率および/または使用エキソヌクレアーゼの開裂効率が悪影響を受けないことが必要である。好ましくは、オリゴヌクレオチドプローブの長さは15ないし60ヌクレオチドの範囲である。より好ましくは、オリゴヌクレオチドプローブの長さは18ないし30ヌクレオチドの範囲である。本発明オリゴヌクレオチドプローブの正確な配列および長さは、一部には、結合する標的ポリヌクレオチドの性質による。特定の具体例のためには、結合位置および長さを変化させて適切なアニーリングおよび融解特性を得てもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドプローブの3'末端ヌクレオチドはブロックされているか、または核酸ポリメラーゼにより伸長できなくされている。便利には、結合基によりオリゴヌクレオチドプローブの末端3'炭素にリポーターもしくは消光剤分子を結合させることにより、かかるブロッキングを行う。好ましくは、リポーター分子は、結合基を介してプローブの末端3'炭素もしくは末端5'炭素に結合することを目的に蛍光有機色素誘導体化される。好ましくは、消光剤分子も有機色素であり、本発明具体例にもよるが蛍光性であってもなくてもよい。例えば、本発明の好ましい具体例において、消光剤分子は蛍光性である。一般的には、消光剤分子が蛍光性であるかどうか、あるいはリポーター分子からの転移エネルギーを非放射性崩壊により放出するかどうかにかかわらず、消光剤の吸収バンドは実質的にリポーター分子の蛍光エミッションバンドと重なるべきである。励起リポーター分子からのエネルギーを吸収するが放射性エネルギーを放出しない非蛍光性消光剤分子は、本明細書で色素原分子(chromogenic molecules)と呼ばれる。特定のプローブのための適当なリポーター-消光剤ペアを選択するために、文献中に多数の利用可能な実際の指針があり、例えば、下記文献がある:Clegg "Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids", Methods in Enzymology, 211:353-389(1992); Wu et al., "Resonance energy transfer: methods and applications", Anal. Biochem. 218:1-13(1994); Pesce et al, editors, Fluorescence Spectrometry (Marcel Dekker, New York, 1971); White et al, Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970)等。また、文献は、リポーター-消光剤ペアを選択するための蛍光性分子および色素原分子ならびにそれらの重要な光学的特性の完全なリストを提供する文献も含み、例えばBerlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, New York, 1949)等がある。さらに、オリゴヌクレオチドに付加できる通常の反応性の基を介して共有結合させるためにリポーター分子および消光剤分子を誘導体化するための文献もあり、例えば、Haugland (上記); Ullmanらの米国特許第3996345号; Khannaらの米国特許第4351760号等がある。

【0009】典型的なリポーター-消光剤ペアを、フルオレセイン類を包含するキサンテン色素、およびローダミン色素から選択してもよい。多くの適当な形態のこれらの化合物は広く市販されており、それらは結合部位としてまたはオリゴヌクレオチドへの結合のための結合官能基として使用可能な置換基をフェニル部分に有している。別のグループの蛍光性化合物はアルファまたはベータ位にアミノ基を有するナフチルアミン類である。1-ジメチルアミノナフチル-5-スルホネート、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホネートおよび2-p-トリルジニル-6-ナフタレンスルホネートはかかるナフチルアミンの化合物に包含される。他の色素としては3-フェニル-7-イソシアネートクマリン、アクリジン類、例えば9-イソチオシアネートアクリジンおよびアクリジンオレンジ; N-(p-(2-ベンゾキサゾリル)フェニル)マレイミド; ベンゾキサジアゾール類、スチルベン類、ピレン類等がある。好ましくは、リポーターおよび消光剤分子をフルオレセイン色素およびローダミン色素から選択する。これらの色素およびオリゴヌクレオチドへの適当な結合法は多くの文献に記載されており、例えば、Khannaら(上記)、Marshall, Histochemical J., 299-303(1975); Mechnenらの米国特許第5188934号、Mechnenらの欧州特許出願第87310256.0号; およびBergotらの国際出願PCT/US90/05565がある。後の4つの文献を参照により本明細書に記載されているものとみなす。

【0010】リポーター分子または消光剤分子をオリゴヌクレオチドの3'または5'末端に結合させるための多くの結合基および方法があり、下記文献に示されている: Eckstein, editor, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991); Zuck

erman et al, Nucleic Acids Research, 15:5305-5321(1987) (オリゴヌクレオチド上の3' チオール基) ; Sharm a et al, Nucleic Acids Research, 19:3019(1991) (3' スルフヒドリル) ; Giusti et al, PCR Methods and Applications, 2:223-227(1993) およびFungらの米国特許第4757141号 (Applied Biosystems, Foster City, Calif. から市販されているAminolink<sup>TM</sup> IIを介した5' ホスホアミノ基) ; Stabinskyの米国特許第4739044号 (3' アミノアルキルホスホリル基) ; Agrawal et al, Tetrahedron Letters, 31:1543-1546(1990) (ホスホラミダイト結合を介する結合) ; Sproat et al, Nucleic Acids Research, 15:4837(1987) (5'メルカプト基) ; Nelson et al, Nucleic Acids Research, 17:7187-7194(1989) (3' アミノ基) 等。好ましくは、合成中にオリゴヌクレオチドに結合しうる市販結合基、例えば、Clontech Laboratories (Palo Alto, Calif.) から市販されているものを用いる。

【0011】また、便利には、ホスホラミダイト基で誘導体化した色素を用いる固相合成の最後にオリゴヌクレオチドの5' ヒドロキシルにローダミンおよびフルオレセイン色素を結合させる (例えば、Wooらの米国特許第5231191号 ; およびHobbs, Jr. の米国特許第4997928号参照)。

【0012】本発明に使用するプライマーおよびプローブの選択は当業者の選択による。本発明は、プライマーまたはプローブの選択について特殊必要事項がなく、また制限もない。かかる選択は当業者の範囲内である。

【0013】プローブは、本発明の実施ができる長さであればいずれの長さであってもよいが、基準として、長いほうのプローブは少なくとも3塩基対を有していなければならない。実施問題として、長いほうのプローブは3塩基対よりも多い塩基対を含むであろう。しかしながら、FETCHの使用による長さの上限はない。長いほうのプローブの長さはFETCHの適用によっては支配されない。なぜなら、FETCHは少なくとも3塩基対である必要性のあるいずれの長さのプローブについても適合するからである。実際問題として、長いほうのプローブは、標的ポリヌクレオチドおよび短いほうのプローブにユニークにハイブリダイゼーションすることを保証する長さを有するであろう。短いほうのプローブは、長いほうのプローブよりも少なくとも2塩基対短いであろう。このことは、短いほうのプローブを作成する場合の基礎的事項である。アリーリングしたプローブの解離温度を計算することによりプローブ間の長さの相違に関する良好な適合が得られることがわかっている。一般則として、プライマーの解離温度としては約55℃以上90℃未満であることが必要である。この計算を行うための便利な手段は、GeneRuner (Hastings Software, Inc.) の例えばバージョン3.04と呼ばれるソフトウェアを使用することである。

【0014】長いほうの遺伝子の5' 末端切断物として短いほうの遺伝子を調製してもよい。あるいは、3' 末端切断物であってもよい。3番目の選択肢は、長いほうの遺伝子の5' および3' 末端を切断することにより短いほうのプローブを作成することである。これらの3つの形態の短いほうのプローブのいずれか1つであればよくいであろう。2種またはそれ以上の末端切断形態を用いることができるが、1の形態のみ、好ましくは5' 末端切断形態のみを用いることが最も簡単である。

【0015】2つのプローブがハイブリダイゼーションした場合、消光剤により発蛍光団の蛍光が効果的に消される限り、発蛍光団および消光剤をどのような組み合わせの塩基対上に置いてもよい。最も簡単な方法は、長いほうのプローブの5' 末端ヌクレオチド上に発蛍光団を置き、短いほうのプローブの3' 末端ヌクレオチド上に消光剤を置くことである。この方法は、発蛍光団の蛍光に対する消光剤分子の影響を最適化することができる。好ましくは、5' および3' 結合基を用いて発蛍光団および消光剤分子をプローブの末端5' 炭素および末端3' 炭素に結合する。しかしながら、本発明において有用な少なくとも一定数の発蛍光団については、発蛍光団および消光剤が離れて存在してもやはり作動しうることが示されている。例えば、発蛍光団および消光剤を数塩基離してもよいことが開示されている米国特許第5538848号参照。その特許によれば、発蛍光団および消光剤が少なくとも15ヌクレオチドまたはそれ以上離れているが有用性を示すことが開示されている。同様に、2つのプローブがハイブリダイゼーションした場合、離すことが発蛍光団のシグナルへの消光剤の影響能を実質的に低下させない限り、発蛍光団および消光剤を離すことが可能である。もちろん、発蛍光団および/または消光剤をプローブ内部のヌクレオチドに結合させることもできる。しかしながら、合成の容易さならびにプローブ対標的およびプローブ対プローブのハイブリダイゼーションの最適化を理由として、上記のごとく発蛍光団および消光剤をプローブの5' および3' 末端に置くことが好ましい。実際、発蛍光団および消光剤を各々のオリゴヌクレオチドの5' または3' 末端ヌクレオチド上に置くと、アッセイが機能的になるであろう。短いほうのプローブ上に発蛍光団を置き、長いほうのプローブ上に消光剤を置くための別の配置をとってもよい。さらに、この配置において、長いほうのプローブは優先的に標的に結合し、かくして、発蛍光団を伴うプローブから十分に離れるため、その蛍光を効果的に消えないこととなる。しかしながら、好ましい構築物は、長いほうのプローブ上に発蛍光団を有するべきである。

【0016】消光剤を有するプローブと発蛍光団を有するプローブとの割合を変化させることによりアッセイを最適化することができる。1:1の割合が良好な結果をもたらす。しかしながら、発蛍光団を有するプローブに

対する消光剤を有するプローブの割合が2:1の場合、より良好な結果が得られた。本発明のこの態様は最適化されていないが、当業者は、異なる割合について通常の試験によるアッセイを行って、最適化しうることがわかる。

#### 【0017】

【実施例】下記実施例は本発明の説明のためのものであり、特許請求された本発明の範囲を限定的に解するものではない。

#### 一般的説明

競争的ハイブリダイゼーションによる蛍光エネルギー転移 (FETCH) の利用を、ヒト・標本中のC型肝炎ウイルス (HCV) のPCRによる検出のためのアッセイとして開発した。前方のプローブ、すなわち短いほうのプローブはTAMRA色素 (N, N, N', N' テトラメチルー6-カルボキシローダミン) を3' 位置に有していた (よって、3' OHはPCR中に伸長不可能)。一般的に使用される蛍光性色素FAMを発蛍光団として使用した。蛍光性色素TAMRAはFANのエミッショ

ンバンドと重なる吸収バンドを有しており、この適用例において消光剤として使用した。

#### 【0018】実施例1

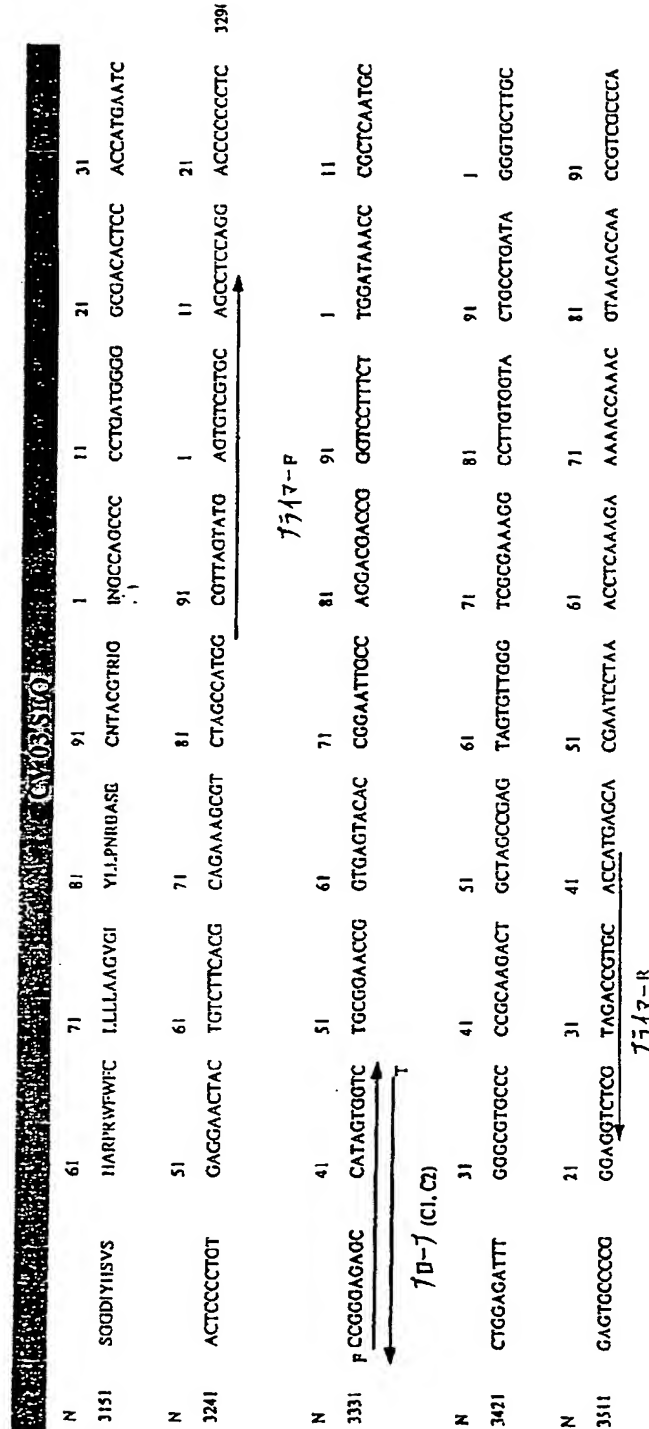
#### プライマーおよびプローブの選択

HCVポリヌクレオチド配列を文献から同定した。すべての既知HCV株を捕らえることのできるアッセイを行うために、すべての株のRNA配列に共通したポリヌクレオチド配列を有する2つのプライマーおよび2つのプローブを選択した。それらがすべての既知HCV株にアニーリングし、類似の解離温度を有し、互いに広範囲にわたる3' 相補性を有しない等の条件を満たすようにプライマーを選択した。選択したものは、文献記載のヌクレオチド番号3290から3543までのHCVの5' 非コーディング領域の254bpのセグメントの横にあるものであった。HCV配列のデータはプライマーに依存した。選択したプローブを下表1-2および4に示す。

#### 【0019】

#### 【表1】





【表2】

オリゴ	順方向プライマー配列	塩基数	分子量	標識
HCV	5'GCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCGCT	26	8008	なし

オリゴ	逆方向プライマー配列	塩基数	分子量	標識
HCVR2	5'GGTGCACGGTCTACGAGACC 3'	20	6124	なし

【表3】

プローブ	標識配列
70-7 C1	5'FAM CCGGGAGAGCCATAGTGGTC PO4
70-7 C2	3'TAMRA GGCCCTCTCGGTATCAC

\* C2の配列についての慣用的でない表示(3'から5'へと表示)はそのC1に対する相補性を目立たせることに役立つ。

表4

	塩基数	分子量	標識
プローブC1	20	6914	6-FAM
プローブC2	17	6065	TAMRA

Gene Runnerバージョン3.04 (Hastings Software Inc.)により分子量を計算した。

## 【0020】実施例2

## プローブの合成

2個のプローブをTriLink Biotechnologies, Inc. (11585 Sorrento Valley Rd., Suite 105, San Diego, CA 92121)において注文合成した。それらは下記のごとく合成された。

## 工程1 オリゴヌクレオチド合成

支持体上でオリゴヌクレオチドを合成し、脱保護して3'リン酸基を生じさせた(Glen Researchカタログ番号20-2913)。

## 工程2 6-FMA付加

次いで、支持体結合オリゴヌクレオチドを15当量の6-FAMアミダイト(Glen Researchカタログ番号10-5901)と手動で反応させて高効率を保証した。

## 工程3 オリゴヌクレオチド脱保護

新鮮な濃アンモニア水を用いてFAM標識オリゴを室温で36時間脱保護した。脱保護後、試薬をデンカンテーションで除去し、ビーズを濯ぎ、溶液と一緒に乾燥させた。

## 工程4 精製

逆相HPLCを用いてFAM標識オリゴヌクレオチドを精製した。FAMは全長の物質上にある唯一のものであり、親油性条件下での取り扱いに有用であり、良好な分離をもたらす。精製後、化合物を乾燥して沈殿するようにした。EtOHを用いて化合物を0.3M NaOAcから沈殿させた。高速遠心分離により生成物を回収 ※

※し、EtOHで2回洗浄した。

## 工程5 最終分析

10 乾燥生成物を水に再懸濁し、定量し、HPLCにより純度を分析した。次いで、化合物を再乾燥して発送できるようにした。

## 【0021】実施例3

FETCHを用いる逆転写酵素-PCRによるHCV RNAの検出

1 工程の逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応としてアッセイを行った。ヒト・血清または血漿からHCV RNAを単離し、精製した。血清または血漿試料を高変性条件下で溶解させてRNAアーゼを不活性化させ、無傷のRNAの単離を保証した。RNAをエタノールで沈殿させ、RNAに結合するQIAmpスピンカラム(Qiagen, Chatsworth, CA)に移した。次いで、カラムを水洗し、RNAを溶離させた。精製RNA鋳型(10μl)をHCVマスターミックス(master mix)(表5参照)(40μl)と混合し、次いで、逆転写してDNAとし、表6にあるようにPerkin Elmer 7700配列分析装置にて同じ試験管中でPCRにより増幅し、検出を行った。PCRを行っている間、いくつかのFAM標識プローブおよびいくつかのTAMRA標識プローブがPCR生成物にアニーリングし、かくしてFAM蛍光の消光が抑制され、検出すべき蛍光が増強された。図1に示すようにFAMの蛍光は温度サイクリングのサイクル数の増加に伴い増大し、PCR生成物量の増加に対応していた。

表5

典型的なHCVマスターミックス

試薬	1本の試験管中の μl数	最終濃度 (40μl)
RNAse 不含の水	26.8	---
10X TaqMan <sup>TM</sup> バッファー	5	1X
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	5	2.5mM
dNTP (各25mM)	0.6	300mM
プライマー HCVC1 (100μM)	0.25	500nM
プライマー HCVC2 (100μM)	0.25	500nM
プローブC1 (25μM)	0.2	100μM
プローブC2 (25μM)	0.2	100μM
RNAse阻害剤 (20U/μl)	0.5	10U
MU/V RT (50U/μl)	0.5	25U
Amplitaqゴールド (5U/μl)	0.5	2.5U

TaqManはRoch Molecular Systems, Inc. の商標である。

表 6

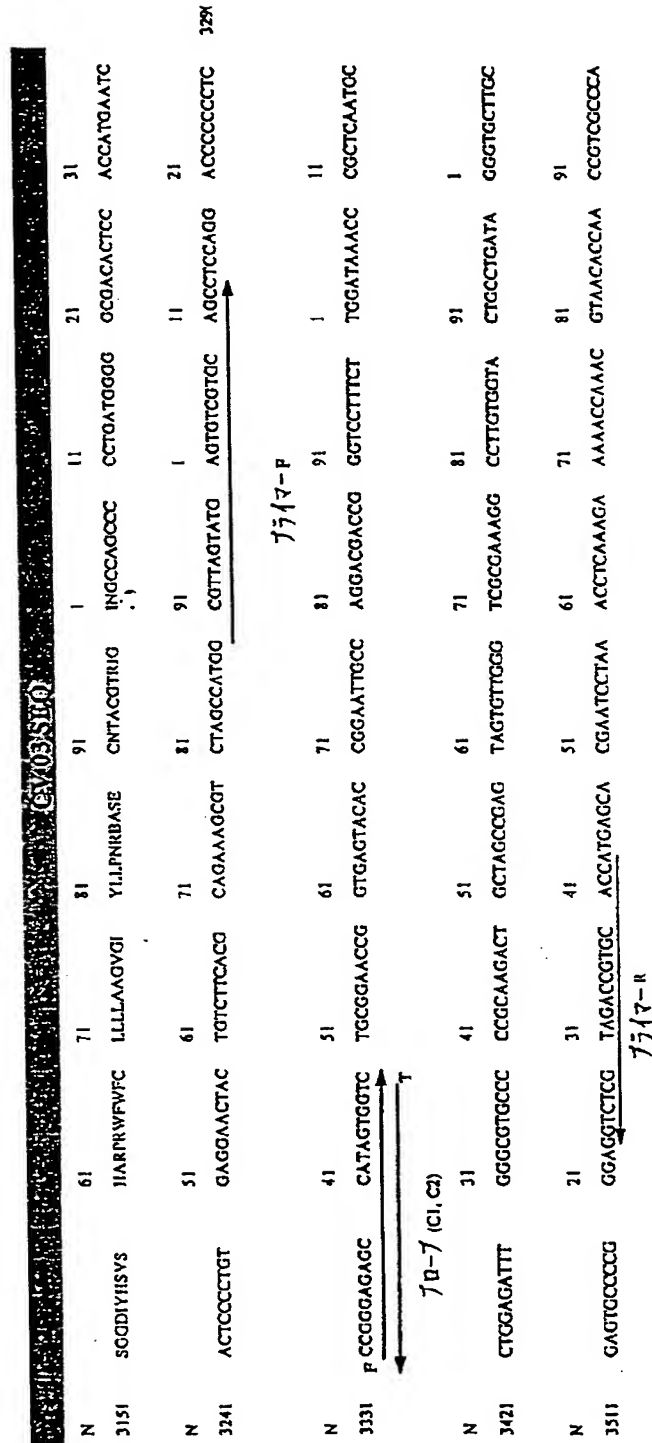
サイクル	温度	時間	繰り返し 回数	ランプタイム (Ramp Time)	自動インCREMENT (Auto Increment)
しない	48℃	60分		自動	
しない	95℃	10分		自動	
する	93℃	15秒	40	自動	
	57℃	30秒			
	72℃	30秒			

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 等しくない長さのプローブを用いる標的HCV RNAのPCR増幅により得られた蛍光シグナルを示す。長い方のプローブは5'末端炭素上に発蛍光団を

10 有し、短いほうのプローブは3'末端炭素上に消光剤を有しており、短いほうのプローブは長いほうのプローブの5'末端から3塩基対欠失させることにより調製された。

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成10年6月19日

【手続補正1】

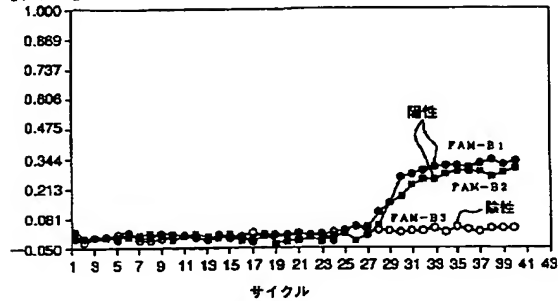
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】



しきい値サイクル計算	しきい値サイクル	ベースライン平均	ベースライン標準偏差
方法: しきい値	FAM-B1 40.000	0.000	0.009
しきい値	FAM-B2 40.000	0.000	0.007
使用しきい値: 1.268	FAM-B3 40.000	0.000	0.008
マルチ標準偏差: 10.0, 0.127			
閾値しきい値: 2.0			
ベースライン			
出角: 3 停止: 15			

フロントページの続き

(72)発明者 ジョゼ・エフ・クアン

アメリカ合衆国93041カリフォルニア州ボ  
ート・ヒューネーム、イースト・スールサ  
イド・ドライブ211番

THIS PAGE BLANK (USPTO)